

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 537 430 A1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **92113140.5**

(51) Int. Cl.⁵: **A61K 35/10**

(22) Anmeldetag: **01.08.92**

(30) Priorität: **17.10.91 DE 4134378**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
21.04.93 Patentblatt 93/16

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL PT
SE**

(71) Anmelder: **RÜTGERSWERKE
AKTIENGESELLSCHAFT
Mainzer Landstrasse 217
W-6000 Frankfurt am Main 1(DE)**

(72) Erfinder: **Riede, Urs N. Prof. Dr.
Bifänge 89
W-7800 Freiburg(DE)
Erfinder: Seubert, Bernd
Meisenweg, 15
W-6803 Edingen(DE)
Erfinder: Schneider, Josef
Schneeburgstrasse, 62
W-7800 Freiburg(DE)**

(54) **Antivirale Mittel.**

(57) Natürliche oder synthetische, modifizierte oder unmodifizierte Ammonium- oder Alkalihuminate mit einem Molekulargewicht bis 50 000 D, deren wäßrige Lösungen keinen Tyndall-Effekt zeigen und nicht fluoreszieren, dienen zur Herstellung eines antiviralen Mittels, insbesondere eines Mittels gegen Retroviren.

EP 0 537 430 A1

Die Erfindung betrifft neue antivirale Mittel, insbesondere solche, die gegen Retroviren wirksam sind.

Virale Infektionen gelten als chemotherapeutisch schwierig beherrschbar. Dies ist darauf zurückzuführen, daß Viren überwiegend den anabolischen Stoffwechsel der befallenen Zellen zu ihrer eigenen Vermehrung ausnutzen. Viele Substanzen, die antiviral wirksam sind, hemmen deswegen gleichzeitig auch den zellulären Stoffwechsel und sind toxisch.

Als Angriffspunkte für eine antivirale Chemotherapie eignen sich eine Vielzahl Virus-spezifischer Reaktionsabläufe wie z. B.

- die Bindung des Virus an seinen Rezeptor, - die Vermehrung der viralen Nukleinsäuren, - die Regulation des viralen Genexpression und - die Morphogenese des Viruspartikels.

In-vitro ließen sich durch Inhibition dieser Vorgänge die verschiedensten Viren blockieren. In-vivo haben sich bisher jedoch nur wenige antivirale Wirkstoffe bewährt. Die Gründe dafür liegen in den hohen Anforderungen sowohl an Spezifität als auch an die Wirkungsbreite antiviraler Wirkstoffe. Nur bei hoher Spezifität werden die viralen Reaktionsketten blockiert, ohne die mit ihnen häufig verwandten Reaktionsabläufe der Zelle zu schädigen. Die hohe Spezifität bedingt aber meist auch eine hohe Selektivität dem Virus gegenüber, das heißt, die Wirkung richtet sich nur gegen eine Virusspezies oder sogar gegen ein Isolat dieser Spezies. Viren können also unter dem Selektionsdruck der Substanz leicht resistent werden, oder die Viruspopulationen eines Patienten enthalten bereits resistente Varianten, die sich bei Anwendung der Wirkstoffe selektiv vermehren.

Es ist deshalb Aufgabe der Erfindung, antivirale Mittel bereitzustellen, die den gesunden tierischen oder menschlichen Stoffwechsel möglichst wenig schädigen und dabei im Sinne eines Breitbandtherapeutikums hochwirksam sind gegen Viren verschiedenster Art.

Die Lösung der Aufgabe besteht in der Verwendung natürlicher oder synthetischer, modifizierter oder unmodifizierter Huminate die durch folgende Merkmale gekennzeichnet sind:

Sie sind physiologisch positiv wirksam, das heißt, sie haben heilende Eigenschaften, sind sehr gering toxisch und weder mutagen noch teratogen (Ames-Test). Ihre wäßrigen Lösungen zeigen keinen Tyndall-Effekt und fluoreszieren nicht. Die Lösung beinhaltet die Verwendung dieser Huminate zur Herstellung antiviraler Mittel, gemäß der Ansprüche 1 bis 4, sowie antivirale Mittel, die diese entsprechenden niedermolekularen Huminate enthalten, gemäß der Ansprüche 5 bis 8.

Es wurde gefunden, daß die oben genannten Huminate sowohl bei Menschen als auch bei Tieren eine antivirale Wirkung zeigen.

Beispiele hierfür sind antivirale Effekte
gegen Bienen-Paralyseviren,
gegen Herpesviren beim Menschen und (Herpes labialis) und Karpfen (sog. Karpfenpocken)
gegen HIV-Viren und andere Retroviren.

In-vitro Versuche haben gezeigt, daß erfindungsgemäße Huminate die Infektiosität der HIV-1 Viren unterdrücken ($IC_{50} = 0,15 \mu g/ml$; $CC_{50} = 200 \mu g/ml$). Als Testsystem diente der Syncytien-essay mit MT-2-Zellen und MOLT-4(8)-Zellen. Da sowohl der Eintritt der Viruspartikel in die Zielzelle, als auch die Syncytienbildung in Form einer Membranfusion ablaufen, läßt sich vermuten, daß die Huminate auf membranständige Strukturen einwirken. Daneben besitzen diese Huminate offenbar noch einen weiteren Angriffspunkt: Sie hemmen die reverse Transkriptase ($IC_{50} = 30 \mu g/ml$) der HIV-1-Viren, sowie eines Maus-Friend-Leukämievirus. Diesen Befunden zufolge ist es möglich, mit den erfindungsgemäß beanspruchten Huminen einen oder mehrere Schritte des HIV-Infektionszyklus, sowie einen Schritt der HIV-induzierten Zytopathogenität zu blockieren.

In den erfindungsgemäßen antiviralen Mitteln einsetzbar und wirksam sind sowohl natürliche, niedermolekulare Ammonium- oder Alkalihuminate, wie sie aus DE-A 37 07 909 oder DE-A 37 36 623 bekannt sind, als auch synthetisch durch Oxidation von mehrwertigen Phenolen in schwach alkalischem wäßrigem Medium entsprechend DE-A 37 07 910 hergestellte niedermolekulare Ammonium- oder Alkalihuminate. Es sind dies dunkelbraune, wasserlösliche Produkte mit einem mittleren Molekulargewicht von 1000, bei einem Streubereich von 300 bis 1500.

Weiterhin wirksam sind aber auch natürliche und synthetische Huminate mit Molekulargewichten bis zu 50 000 D, sofern sie den folgenden Merkmalen entsprechen:

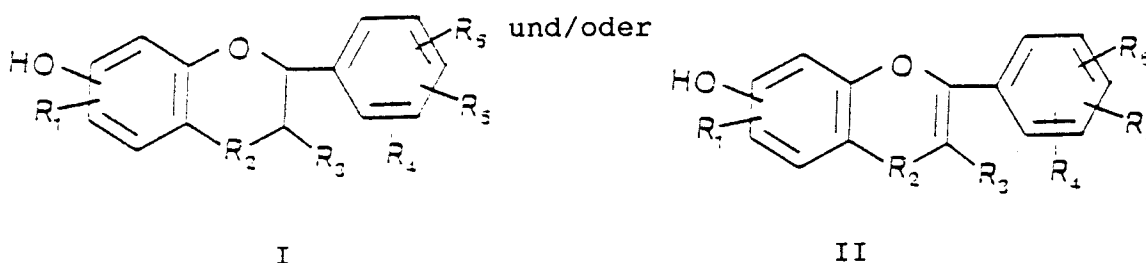
Sie sind physiologisch positiv wirksam, das heißt, sie haben heilende Eigenschaften, sind sehr gering toxisch und weder mutagen noch teratogen.

Ihre wäßrigen Lösungen zeigen keinen Tyndall-Effekt und fluoreszieren nicht. Entsprechende Prüfungen dieser Eigenschaften werden zweckmäßigerweise mit wäßrigen Lösungen in einer Konzentration durchgeführt, daß sie noch etwa 50 % der Transmission des eingestrahlten Lichtes haben. Beispiele für entsprechende, synthetische Huminate sind die gemäß einer parallelen Anmeldung nach folgendem Verfahren hergestellten Huminate.

Diese Huminate werden hergestellt durch Oxidation mehrwertiger Phenole in alkalischem, wäßrigem Medium bei einer Reaktionstemperatur unter 40 °C und anschließende Isolierung, wobei der pH-Wert des Reaktionsmediums während der Oxidation immer über 9 liegt und die Zuführung des Oxidationsmittels so dosiert wird, daß der Gehalt der den mehrwertigen Phenolen entsprechenden Chinonen immer kleiner ist als 0,5 %, bezogen auf die eingesetzten mehrwertigen Phenole, und daß die Oxidationsreaktion abgebrochen wird, wenn die Chinonkonzentration trotz Zufuhr von Oxidationsmittel absinkt, bevorzugt auf Werte unter 0,05 %.

Nach der Oxidationsreaktion, die als rein chemische Oxidation, bevorzugt mit Sauerstoff oder einem sauerstoffhaltigen Gasgemisch als Oxidationsmittel, aber auch als elektrochemische oder plasmachemische Oxidation durchgeführt werden kann, wird die Reaktionslösung auf einen pH-Wert im Bereich zwischen 4 und 5 angesäuert und mittels an sich bekannter Methoden wie präparative Chromatographie, Ultrafiltration oder -zentrifugation oder Elektrodialyse aufgearbeitet.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß modifizierte Ammonium- oder Alkalihuminate eine bis um den Faktor 10 gegenüber den oben genannten Huminen gesteigerte antivirale Wirksamkeit zeigen. Diese modifizierten Huminate, die Gegenstand einer parallelen Anmeldung der Anmelderin sind, werden hergestellt durch Oxidation der Verbindungen der allgemeinen Formeln



wobei R₁, R₃ und R₄ gleich oder verschieden sind und eine OH-Gruppe oder Wasserstoff darstellen, R₂ eine CO- oder CH₂-Gruppe bedeutet und R₅ und R₆ gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, eine OH- oder Methoxygruppe darstellen, wobei R₄, R₅ und R₆ nicht alle gleichzeitig Wasserstoff sind, in alkalischer, wäßriger Lösung (pH 9).

Dabei können die Verbindungen gemäß der Formeln I und II als einzelne Reinsubstanzen sowie auch im beliebigen Gemisch miteinander eingesetzt werden. Sie können im Reaktionsgemisch auch mit mehrwertigen Phenolen eingesetzt werden, was aus wirtschaftlichen Gründen durchaus angebracht sein kann.

BEISPIELE

Beispiel 1

In einem gegen Alkalien beständigen Rührwerkbehälter werden 95 kg Kaliumhydroxid (DAB 9-Qualität) in 1000 l entmineralisiertem Wasser (pH 5 bis 7; Leitfähigkeit unter 5 µS/cm) gelöst.

Nach dem Abkühlen auf eine Temperatur unterhalb 40 °C werden unter Köhlen im Verlauf von 45 Minuten 55 kg Hydrochinon (chem. rein., über 99 %) zugegeben, wobei die Temperatur des Gemisches 40 °C nicht übersteigt. Es stellt sich ein pH-Wert von etwa 10 ein.

Die Apparatur wird nun verschlossen. Dann wird unter Rühren Luft, die über ein alkalisches Filtersystem von Staub, CO₂ und anderen Kontaminanten gereinigt wird, über die Oberfläche geleitet.

Der Luftstrom wird so gedrosselt, daß der Gehalt an 1,4-Benzochinon immer kleiner ist als 0,5 %, bezogen auf das eingesetzte Hydrochinon. Die Reaktionstemperatur wird immer unter 40 °C gehalten. Der pH-Wert bleibt immer über 9.

Nach 10 bis 15 Tagen sinkt der Gehalt an Hydrochinon der braunen Reaktionslösung auf unter 2 %. Trotz weiterer Luftzufuhr sinkt der Gehalt an 1,4-Benzochinon auf Werte unter 0,05 %. In diesem Zeitpunkt wird die Reaktion abgebrochen. Die Luftzufuhr wird beendet und die Reaktionsmischung wird durch Zugabe eines sauren Ionenaustausches auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt. Danach wird der Ionenaustauscher durch zentrifugieren abgetrennt und die saure Lösung einer Ultrafiltration unterworfen, wobei ein Filtrationsgerät mit 0,5 µm Feinheit verwendet wird.

Das Ultrafiltrat wird unter schwachem Vakuum bis zu einer Huminat-Konzentration von 40 Gew.-% eingedunstet. Diese Lösung ist noch gut handhabbar. Sie enthält Huminate mit Molekulargewichten im Bereich 1000 bis 50 000. Die Lösung zeigt keinen Tyndall-Effekt und enthält keine fluoreszierenden Komponenten.

Beispiel 2

29 g (0,1 Mol) Catechin (2-3,4-Dihydroxyphenyl)-chroman-3,5,7-triol) werden bei Raumtemperatur in 1000 ml einer wäßrigen 0,8 molaren NatronlaugeLösung gelöst.

Die so erhaltene Lösung (pH 10) wird in einen mit Rührer, Thermometer, Gaseinführungs- und Überdruckentlastungs-Vorrichtung versehenen Glasreaktor gebracht. Danach wird bei Raumtemperatur durch die Lösung in ständigem Gasstrom Luft geleitet, die zuvor in einer Gaswaschflasche mit NaOH-Lösung von CO₂ und Staubpartikeln gereinigt wurde.

Der Gasstrom wird so reguliert, daß sich eine Temperatur der Reaktionslösung von 30 °C einstellt.

Nach einer Reaktionszeit von 10 Tagen, wenn trotz weiterer Luftzufuhr die Temperatur der Reaktionslösung absinkt, ist die Umsetzung beendet. Die entstandene dunkelbraune Lösung wird durch Zugabe von verdünnter Essigsäure auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt und danach mittels einer Ultrafiltration gereinigt.

Die gereinigte Lösung enthält 4,2 % eines modifizierten Huminats mit einem mittleren Molekulargewicht von 2 500 D bei einer Streubreite von 1 000 bis 30 000 D. Die Lösung ist dunkelbraun, fluoresziert nicht und zeigt keinen Tyndall-Effekt.

Beispiel 3

Huminate der Beispiele 1 und 2 werden auf ihre Wirkung hinsichtlich der Infektiosität von HIV-1 Viren getestet. Als Test-System dient der Syncytien-assay mit MT-2-Zellen und MOLT-4(8)-Zellen.

Erhalten werden folgende Ergebnisse:

Huminat aus Bsp. 1	IC ₅₀ [µg/ml]	CC ₅₀ [µq/ml]
1	0,15	200
2	0,05	25

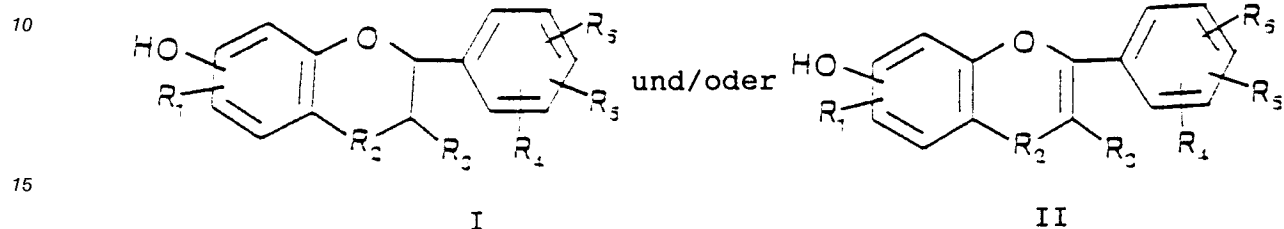
Beispiel 4

Huminate der Beispiele 1 und 2 wurden in Zuckerlösung gelöst, so daß etwa 1 %ige zuckerhaltige Huminatlösungen erhalten wurden. Diese wurden an Bienen verfüttert die kurz zuvor mit Bienen-Paralyseviren infiziert worden waren. Die aufgrund der Infektion zu erwartende Varoatose-Erkrankung kam nicht zum Ausbruch.

Patentansprüche

- Verwendung natürlicher oder synthetischer, modifizierter oder unmodifizierter Ammonium- oder Alkalihuminate mit einem Molekulargewicht bis 50 000 D, deren wäßrige Lösungen keinen Tyndall-Effekt zeigen und nicht fluoreszieren zur Herstellung eines antiviralen Mittels.
- Verwendung natürlicher oder synthetischer, modifizierter oder unmodifizierter Ammonium- oder Alkalihuminate mit einem Molekulargewicht bis 50 000 D, deren wäßrige Lösungen keinen Tyndall-Effekt zeigen und nicht fluoreszieren zur Herstellung eines Mittels gegen Retroviren.
- Verwendung natürlicher oder synthetischer, modifizierter oder unmodifizierter Ammonium- oder Alkalihuminate mit einem Molekulargewicht bis 50 000 D, deren wäßrige Lösungen keinen Tyndall-Effekt zeigen und nicht fluoreszieren mit zur Herstellung eines Anti-HIV-Mittels.
- Verwendung natürlicher oder synthetischer, modifizierter oder unmodifizierter Ammonium- oder Alkalihuminate mit einem Molekulargewicht bis 50 000 D, deren wäßrige Lösungen keinen Tyndall-Effekt zeigen und nicht fluoreszieren zur Herstellung eines Mittels gegen die viral induzierte Bienenparalyse.
- Antivirale Mittel, dadurch gekennzeichnet, daß sie natürliche oder synthetische, modifizierte oder unmodifizierte Ammonium- oder Alkalihuminate enthalten, mit einem Molekulargewicht bis 50 000 D, deren wäßrige Lösungen keinen Tyndall-Effekt zeigen und nicht fluoreszieren.

6. Mittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Huminate natürlichen Ursprungs sind.
7. Mittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Huminate synthetisch durch Oxidation mehrwertiger Phenole in wäßriger, alkalischer oder ammoniakalischer Lösung hergestellt sind.
8. Mittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Huminate synthetisch hergestellt sind durch Oxidation von Verbindungen der allgemeinen Formeln,



wobei R_1 , R_3 und R_4 gleich oder verschieden sind und eine OH-Gruppe oder Wasserstoff darstellen, R_2 eine CO- oder CH_2 -Gruppe bedeutet und R_5 und R_6 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, eine OH- oder Methoxygruppe darstellen, wobei R_4 , R_5 und R_6 nicht alle gleichzeitig Wasserstoff sind, in alkalischer, wässriger Lösung.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 92 11 3140

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
X	Z. ALLG. MIKROBIOL. Bd. 15, Nr. 1, 1975, Seiten 25 - 30; RENATE KLÖCKING ET AL.: 'Wirkung von Ammoniumhumat auf einige Virus-Zell-Systeme'	1,2,5,6	A61K35/10
Y	* Seite 25 - Seite 26 *	3,4,7,8	
Y	PHARMAZIE Bd. 34, Nr. 5-6, 1979, Seiten 292 - 293; RENATE KLÖCKING ET AL.: 'Gewinnung, Charakterisierung und antivirale Aktivität von Phenolkörperpolymerisaten'	3,4,7,8	
	* Seite 292 - Seite 293 *		
D,X	EP-A-0 281 678 (RÜTGERSWERKE AG) 14. September 1988 * Ansprüche 1-11 *	5,7	
D,X	EP-A-0 281 679 (RÜTGERSWERKE) 14. September 1988 * Ansprüche 1-7 *	5,6	
D,X	EP-A-0 313 718 (RÜTGERSWERKE AG) 3. Mai 1989 * Ansprüche 1-12 *	5,6	
P,X	Biosis Abstract Nr. 43102365 Schneider J. et al: Inhibition of HIV-1 infection by synthetic huminates & AIDS-conference July 19-24, 1992 *Titel *	1-3,5,7	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 10 NOVEMBER 1992	Prüfer TZSCHOPPE D. A.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			